

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Diseño de un sistema de detección RT-PCR
múltiple para virus de *Carica papaya*

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

María Gabriela Cañada Bautista

Edison Gonzalo Reyes Proaño

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mis padres, por apoyarme en este camino de vida que he decidido seguir. A mi mamá por inspirarme a convertirme en una mujer de ciencia y a mi papá por ser mi soporte en cada decisión tomada, ambos son mi inspiración en la vida para seguir lo que me gusta sin remordimientos. También se lo dedico a mi pequeña Anto, sus consejos, carácter y apoyo incondicional me han formado y ayudado a convertirme en lo que soy hoy. Y finalmente, a aquellos familiares que han sido parte fundamental en mi vida y carrera, sin ustedes no lo hubiera logrado.

María Gabriela Cañada Bautista

Quisiera dedicar este trabajo a mis padres, pieza fundamental de mi vida y por su apoyo, no me alcanzará esta vida para demostrarles mi agradecimiento. A mi hermana por su apoyo incondicional y consejos, por esas alarmas que levantaban a todos en la casa y me permitían llegar temprano a mis clases. A mis tíos Mariana, Zoila y Carlos por ayudarme incondicionalmente en los últimos 4 años. A Cesar Jalca por su apoyo cuando más lo necesité, así como su motivación constante de ser un mejor científico. A mis amigos, Eduardo, Gina, Gaby y Carlos por ser fuente de inspiración para mejorar cada día más, por ser una parte importante de mi vida, por esas tardes recogiendo mangos, saliendo a dedo del básico y principalmente por su amistad, por motivarme a seguir adelante. A mi tutor Diego Quito-Avila por su amistad, consejo y tutoría fuera del aula y del lab, por confiar en mí y realizar aportes significativos a mi vida académica y profesional.

Edison Gonzalo Reyes Proaño

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecerle a Dios por guiar mi vida hasta este punto y haberme dado las mejores experiencias durante el camino. Mi más sincero agradecimiento a la ESPOL y a todos los profesores que he tenido en estos años, por sembrar en mi ese deseo de querer descubrir y cuidar el mundo en el que vivimos. A todos mis amigos por ayudarme a disfrutar de esta etapa y hacer más llevadera la vida universitaria, con mención especial para Edison por ayudarme a descubrir el mundo de la investigación y ser mi guía durante el proceso. Finalmente, a mi tutor Diego Quito A. por darme la oportunidad de incursionar en esta área y ser un ejemplo a seguir sobre cómo se debe estar apasionado por el trabajo que se ejerce.

María Gabriela Cañada Bautista

Quisiera agradecer a los profesores de mi facultad por su paciencia e impartirme sus clases, aunque cayera dormido en medio de ellas debido al cansancio. A mis exprofesores, Migdalia Miranda y Luis Galarza por ser los primeros en motivarme a incursionar en la investigación. A las veces que tiré la moneda, así como las malas y buenas decisiones de mi vida que me permitieron aprender y tomar el rumbo adecuado en este largo viaje.

Edison Gonzalo Reyes Proaño

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *María Gabriela Cañada Bautista* y *Edison Gonzalo Reyes Proaño* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

María Gabriela
Cañada Bautista

Edison Gonzalo Reyes
Proaño

EVALUADORES

.....
Ing. Diego Gallardo, MsC.

PROFESOR DE LA MATERIA

.....
Ing. Diego Quito Ávila, PhD.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El cultivo de papaya (*Carica papaya*) en Ecuador se encuentra focalizado en Guayas, Manabí y Los Ríos. Ecuador ocupa el octavo lugar entre los países productores de papaya en Latinoamérica, sin embargo, no se ha potenciado la producción de esta fruta debido a problemas fitosanitarios como hongos y virus. Debido a la naturaleza biológica de los virus, las plantas infectadas deben ser eliminadas para evitar la propagación del agente microbiano en el cultivo. Por estas razones, se requiere constantemente de métodos de detección de virus confiables y asequible. Este proyecto consiste en el diseño y aplicación de un sistema de detección mediante RT-PCR múltiplex a partir de ARN total obtenido de *C. papaya*. El desarrollo del sistema se llevó a cabo a través de la técnica de RT-PCR, cuyo protocolo fue optimizado para obtener un mejor rendimiento. Como resultado principal, obtuvimos dos tríplex (PpVQ, PSFaV, ndhB y PpVE, PRSV, ndhB) cuya detección se logra hasta en 10^{-1} de la muestra diluida. Asimismo, se diseñaron cebadores (iniciador y terminador) con un alto nivel de especificidad y se logró validar la funcionalidad del protocolo modificado para la obtención del sistema multiplex. De esta forma, el desarrollo de los tríplex permite la optimización del uso de reactivos, enzimas y buffers en el diagnóstico de enfermedades virales, así como la reducción de los desechos de laboratorio generados a partir de pruebas de diagnóstico.

Palabras Clave: Papaya, virus, RT-PCR, múltiplex, Ecuador.

ABSTRACT

Papaya (Carica papaya) cultivation in Ecuador is concentrated in Guayas, Manabí and Los Ríos. Ecuador ranks eighth among papaya producing countries in Latin America, however, the production of this fruit has not been enhanced due to phytosanitary problems such as fungi and viruses. Due to the biological nature of viruses, infected plants must be eliminated to prevent the spread of the microbial agent in the crop. For these reasons, reliable and affordable virus detection methods are constantly required. This project consists of the design and application of a detection system by RT-PCR multiplex from total RNA obtained from C. papaya. The development of the system was carried out through the RT-PCR technique, whose protocol was optimized to obtain a better performance. As the main result, we designed two triplexes (PpVQ, PSFaV, ndhB and PpVE, PRSV, ndhB) whose detection is achieved in up to 10^{-1} of the diluted sample. Likewise, primers (forward and reverse) with a high level of specificity were designed and the functionality of the modified protocol was validated to obtain the multiplex system. In this way, the development of triplexes allows the optimization of the use of reagents, enzymes, and buffers in the diagnosis of viral diseases, as well as the reduction of laboratory waste generated from diagnostic tests.

Keywords: *Papaya, virus, RT-PCR, multiplex, Ecuador.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	II
ABREVIATURAS.....	VI
SIMBOLOGÍA.....	VII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introducción.....	1
1.1. Descripción del problema.....	2
1.2. Justificación del problema.....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos Específicos.....	3
1.4. Marco teórico.....	3
1.4.1. Caracterización de <i>C. papaya</i>	3
1.4.2. Virus en <i>C. papaya</i>	4
<i>Virus de la Mancha anular de la papaya (Papaya ringspot virus, PRSV)</i>	4
<i>Papaya Sticky Fruit-associated Virus (PSFaV)</i>	5
<i>Papaya Virus Q (PpVQ)</i>	6
<i>Papaya Virus E</i>	8
1.4.3. Métodos de detección de virus en plantas.....	9
CAPÍTULO 2.....	11
2. Metodología.....	11
2.1. Análisis de secuencias.....	11

2.1.1.	Alineamiento múltiple	11
2.1.2.	Diseño de cebadores	11
2.2.	Técnicas moleculares	13
2.2.1.	Extracción de ácidos nucleicos	13
2.2.2.	Generación de ADN complementario	13
2.2.3.	Amplificación de fragmentos de interés mediante PCR	14
2.2.4.	Electroforesis	15
2.3.	Diseño de sistema múltiplex	15
2.3.1.	Determinación de combinaciones para sistema de detección multiplex.	15
2.4.	Validación	15
2.4.1.	Validación Individual de cebadores	16
2.4.2.	Validación Múltiplex.....	16
CAPÍTULO 3.....		18
3.	Resultados y Análisis	18
3.1.	Sistema de detección múltiple	18
3.1.1.	Validación individual de cebadores	18
3.1.2.	Sistemas de detección compatibles	19
3.1.3.	Concentraciones óptimas	22
3.1.4.	Protocolos de termociclado óptimos.....	23
3.2.	Análisis de sensibilidad.....	24
CAPÍTULO 4.....		25
4.	Conclusiones y Recomendaciones	25
4.1.	Conclusiones	25
4.2.	Recomendaciones	26
BIBLIOGRAFÍA.....		27
APÉNDICE.....		31

Apéndice A: Números de accesoión de los genomas empleados en este estudio ... 31

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
PpVQ	Virus Q de la Papaya
PRSV	Virus de la Mancha Anular de la Papaya
PpVE	Virus E de la Papaya
PSFaV	Virus asociado a la fruta pegajosa de la papaya
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

SIMBOLOGÍA

μl	Microlitro
ng	Nanogramo
nt	Nucleótido
aa	Aminoácido
pb	Pares de bases

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Síntomas de PRSV en a) y b) frutos, c) hojas de <i>C. papaya</i> . [Elaboración propia].....	4
Ilustración 2: Organización genómica genérica de <i>Potyvirus</i> [Por: (Viralzone, 2022)].	5
Ilustración 3: Síntomas en <i>C. papaya</i> por infección con PpVQ y PSFaV. Exudación espontánea de látex en frutos y necrosis en ápice de hojas inmaduras y ápice foliar en <i>C. papaya</i> [Por: (Reyes-Proaño et al., 2022)].	6
Ilustración 4: Organización genómica de PSFaV [Por: (Reyes-Proaño et al., 2022)]. .	6
Ilustración 5: Dinámica entre Umbravirus y Tombusviridae en plantas con síntomas de PSD [Por: Sa Antunes et al., 2020].	8
Ilustración 6: Organización genómica de PpVE [Por: (Medina-Salguero et al., 2019)]	9
Ilustración 7: Región conservada de PpVQ (Gen polimerasa).....	11
Ilustración 8: Región conservada de PpVE (Gen fosfoproteína).....	12
Ilustración 9: Región conservada de PRSV (Gen cápside proteica).....	12
Ilustración 10: Validación individual de los cebadores sintetizados a diferentes temperaturas (ndhB, PSFaV, PpVQ).	18
Ilustración 11: Validación individual de los cebadores sintetizados a diferentes temperaturas (PRSV, PpVE) [M: marcador molecular].	19
Ilustración 12: Resultados del sistema PpVE, PpVQ, ndhB. [M: marcador molecular]	19
Ilustración 13: Resultados del sistema PpVE, PSFaV, ndhB. [M: marcador molecular]	20
Ilustración 14: Resultados del sistema PpVE, PRSV, ndhB. [M: marcador molecular]	20
Ilustración 15: Resultados del sistema PpVQ, PSFaV, ndhB. [M: marcador molecular]	21
Ilustración 16: Resultados del sistema PpVQ, PRSV, ndhB. [M: marcador molecular]	21
Ilustración 17: Resultados del sistema PSFaV, PRSV, ndhB. [M: marcador molecular]	22

Ilustración 18: Ensayo de sensibilidad del tríplex PpVQ, PSFaV, ndhB. [M: marcador molecular]	24
Ilustración 19: Ensayo de sensibilidad del tríplex PpVE, PRSV, ndhB. [M: marcador molecular]	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cebadores diseñados para detección de virus en <i>C. papaya</i>	12
Tabla 2: Cantidades de reactivos por reacción.....	13
Tabla 3: Volumen de reactivos.....	14
Tabla 4: Protocolo de termociclado para el sistema de detección múltiple.....	14
Tabla 5: Posibles combinaciones de cebadores para implementación de PCR tríplex.	15
Tabla 6: Concentraciones de reacción de PCR individual.	16
Tabla 7: Protocolo de termociclado individual.....	16
Tabla 8: Concentraciones de reacción PCR del sistema PRSV, PpVE, ndhB.....	22
Tabla 9: Concentraciones de reacción PCR del sistema PSFaV, PpVQ, ndhB.....	23
Tabla 10: Condiciones de termociclado para la detección simultanea de PpVQ, PSFaV y ndhB,.....	23
Tabla 11: Condiciones de termociclado para la detección simultanea de PRSV, PpVE y ndhB,.....	23

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya*) se constituye como la tercera fruta más comercializada del mundo, después del banano. Ecuador se posiciona como el productor del 0.36% de la papaya a nivel mundial y ocupa la octava posición como productor en Latinoamérica (PRO-ECUADOR, 2015)(Granda-Villagómez, 2021). De acuerdo con la Subgerencia de Análisis de Productos y Servicios de la Corporación Financiera Nacional (2020) se ha registrado un incremento de los terrenos de producción agrícola destinados a este frutal entre el 2016 y 2019 mientras que la producción del 2019 cifra en 237 802.49 toneladas métricas. Por otro lado, la productividad de este frutal ha sido afectada por enfermedades causadas por agentes patógenos como fitoplasmas, hongos y virus los cuales reducen el periodo de vida y la calidad del producto (Rojas-Martínez et al., 2011) .

Entre los virus patógenos de la papaya encontramos a Papaya virus E (PpVE), papaya virus Q (PpVQ), Papaya Sticky Fruit-associated virus (PSFaV), Papaya meleira virus 2 (PMeV2) y el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV). De acuerdo con los últimos estudios realizados en Ecuador, no se ha reportado la presencia de PMeV2, sin embargo, un virus homólogo (PpVQ) fue descrito con anterioridad por (Quito-Avila et al., 2015) por lo que su estudio es de interés epidemiológico.

La infección sistémica por PRSV produce deformación del fruto, atrofia y amorfia en las hojas inmaduras, así como la aparición de pigmentaciones circulares semejantes a anillos en la epidermis de los frutos (Gonsalves et al., 2010).

Por otro lado, la enfermedad pegajosa de la papaya (PSD) comprende la infección simultánea de Papaya Meleira virus (PMeV) y un virus homólogo de PpVQ, lo que reduce la viscosidad del látex (Abreu et al., 2015). Además, se pueden observar exudaciones espontáneas de látex de baja viscosidad en la epidermis de la fruta cuya oxidación se resume a manchas negras y pegajosas. Es así como los virus antes mencionados deterioran e incluso eliminan el valor comercial del fruto (Sa Antunes et al., 2020). Estudios actuales no han detectado PMeV en el Ecuador, sin

embargo, observaciones previas a este estudio han asociado la presencia del virus asociado al fruto pegajoso de la Papaya (PSFaV, por sus siglas en inglés) con síntomas similares a la enfermedad pegajosa de la papaya reportada en Brasil.

En base a lo expuesto por (Evans et al., 2021) las enfermedades virales en papaya figuran entre las dos principales limitantes del crecimiento de agroindustrial de este fruto. Debido a la naturaleza infecciosa de estos agentes fitopatógenos, es imperativo realizar mejoras en los métodos de detección para un manejo oportuno de estas afecciones en las plantaciones de *C. papaya*.

1.1. Descripción del problema

Ecuador es el octavo exportador de papaya (*Carica papaya*) en América Latina. El rendimiento de este cultivo ha ido decreciendo a causa de fitopatógenos (virus), provocando pérdidas en la producción mayores al 80%. En los últimos años se han descubierto infecciones virales múltiples en papaya por lo cual es necesaria la implementación de un protocolo de detección viral múltiple para este cultivo. El diagnóstico convencional de distintos virus en *C. papaya* se realiza a través de técnicas moleculares con reacciones individuales para cada patógeno. El presente proyecto busca reducir los costos operacionales para la detección de los virus más patogénicos de *C. papaya* (PRSV, PpVQ, PpVE, PSFaV) a través de un sistema multiplex RT-PCR. Este método de detección se proporcionaría a aquellos productores de papaya que busquen conocer el estado de salud de sus cultivos con respecto a los virus contemplados en este protocolo.

1.2. Justificación del problema

Los diagnósticos basados en pruebas moleculares ofrecen un resultado de alta resolución con bajos riesgos de respuestas no específicas (falsos negativos o positivos). Sin embargo, debido a la dificultad requerida para implementar un sistema de diagnóstico múltiple, estos no son diseñados.

Las pruebas de diagnóstico único mediante RT-PCR convencional generan grandes volúmenes de desechos (geles de agarosa, acrilamida, reactivos), muchos de los cuales tienen como receptor final al medioambiente tras su

posterior incineración. La reducción en la cantidad de reactivos requeridos para un diagnóstico molecular permitirá una reducción en los costos operativos, impacto ambiental, así como brindar mayor accesibilidad económica a los productores interesados en monitorear sus cultivos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Diseñar un sistema de detección multiplex para virus patógenos en *Carica papaya* mediante RT-PCR para la disminución de costos y desechos derivados de los procesos de diagnóstico molecular.

1.3.2. Objetivos Específicos

- i. Determinar las secuencias óptimas de los cebadores para la detección de los virus PSFaV, PRSV, PpVQ y PpVE mediante análisis bioinformático para su posterior síntesis.
- ii. Optimizar el protocolo de termociclado para la detección molecular simultánea de 4 virus (PSFaV, PRSV, PpVQ, PpVE) y un gen constitutivo de la planta (ndhB) mediante ensayos a diferentes temperaturas y tiempos de reacción (bajo condiciones controladas).
- iii. Determinar las concentraciones de reacción de cada cebador mediante múltiples ensayos de PCR para la detección óptima de cada objetivo viral (PSFaV, PRSV, PpVQ, PpVE) y gen constitutivo de la planta (ndhB).

1.4. Marco teórico

1.4.1. Caracterización de *C. papaya*

Carica papaya o comúnmente llamada “papaya” o “lechosa” es una planta herbácea originaria del trópico mesoamericano perteneciente a la familia *Caricaceae* (Siar et al., 2011). Esta familia a pesar de haberse originado en el continente africano se ha diversificado en trópico americano donde habitan 4 de sus cinco géneros *Carica*, *Jacaratia*, *Jarilla* y *Vasconcellea*, mientras que *Cylicomorpha* se encuentra a lo largo de las zonas tropicales africanas (Antunes

Carvalho & Renner, 2012). *C. papaya* es la planta más representativa de las caricáceas debido a sus variedades con frutos de exótico sabor, alto contenido en vitaminas y minerales; motivos por los cuales su cultivo se ha extendido en las regiones tropicales y subtropicales (Jiménez Díaz, 2002).

1.4.2. Virus en *C. papaya*

Virus de la Mancha anular de la papaya (Papaya ringspot virus, PRSV)

El virus PRSV pertenece al género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*, orden *Patata virales*, reino *Orthornaviridae*. Su distribución actual es cosmopolita infectando un sinnúmero de hospederos, entre los cuales encontramos a diferentes cucurbitáceas y papaya. Su vía de transmisión es principalmente a través de áfidos de manera no persistente y de acuerdo con (Desbiez & Lecoq, 2021) este virus se caracteriza por generar síntomas visibles de mosaico-clorosis en las hojas y deformación en las mismas, además de causar deformación y manchas anulares en la fruta, de ahí su nombre. Las plantas jóvenes infectadas se verán atrofiadas y no producirán cosechas económicamente viables. En la Ilustración 1 se encuentran representados los síntomas generados por la infección de PRSV en *C. papaya*.

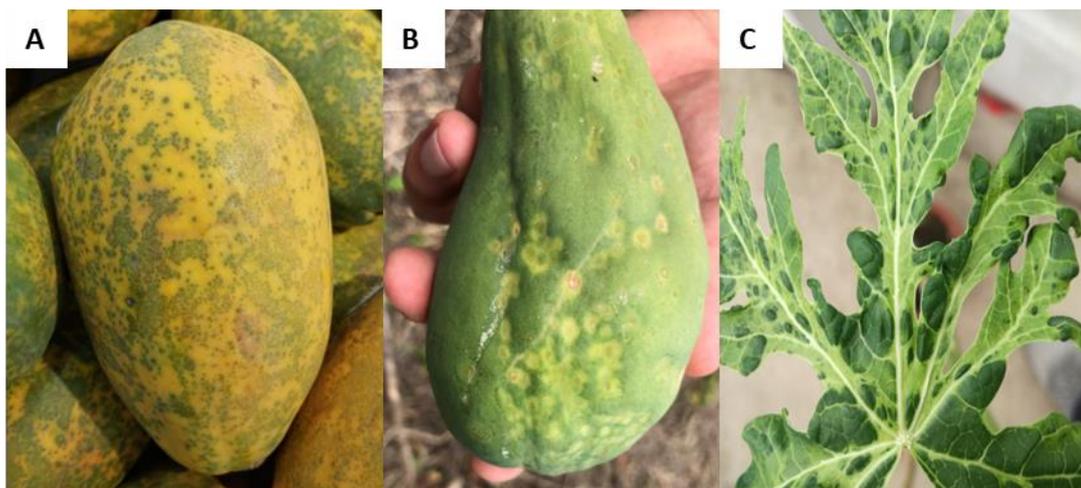


Ilustración 1: Síntomas de PRSV en a) y b) frutos, c) hojas de *C. papaya*. [Elaboración propia]

La información genética de PRSV se encuentra distribuida en una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo con un marco abierto de lectura. La transcripción da como resultado una poliproteína que puede ser segmentada en

10 proteínas funcionales (Cornejo-Franco et al., 2018). La estructura genómica de PRSV al igual que otros *Potyvirus* pueden ser representada en la Ilustración 2.

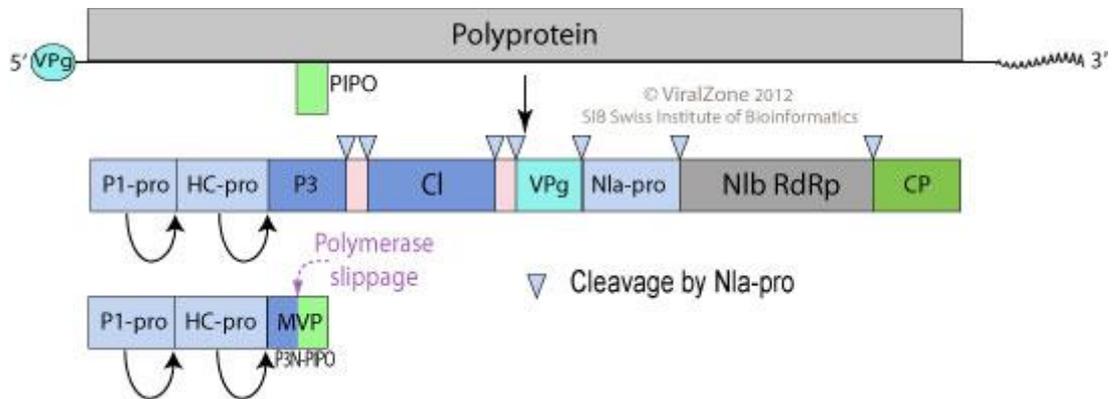


Ilustración 2: Organización genómica genérica de *Potyvirus* [Por: (Viralzone, 2022)].

De acuerdo con (Mishra & Patil, 2018) la región codificante de la cápside es una de región conservada en el genoma de PRSV, motivo por el cual se la emplea como punto de partida en análisis de filogenia. Además, esta región es uno de los segmentos de interés para el desarrollo de cebadores para detección mediante RT-PCR.

Papaya Sticky Fruit-associated Virus (PSFaV)

PSFaV es un virus de ARN bicatenario cuya asignación taxonómica aún no ha sido definida, pero se encuentra distantemente relacionado a miembros de la familia *Totiviridae* perteneciente al orden *Ghabrivirales*. De acuerdo con lo reportado por (Reyes-Proañó et al., 2022), la coinfección de este virus junto con PpVQ ha sido asociada con síntomas tipo PSD (enfermedad pegajosa de la papaya) en cultivos de *C. papaya*. Los síntomas exhibidos por las plantas abarcan parches de decoloración irregulares, costras de látex seco en la piel de frutos inmaduros y látex oxidado con daño severo en la piel de frutos maduros, como se puede observar en la Ilustración 3.

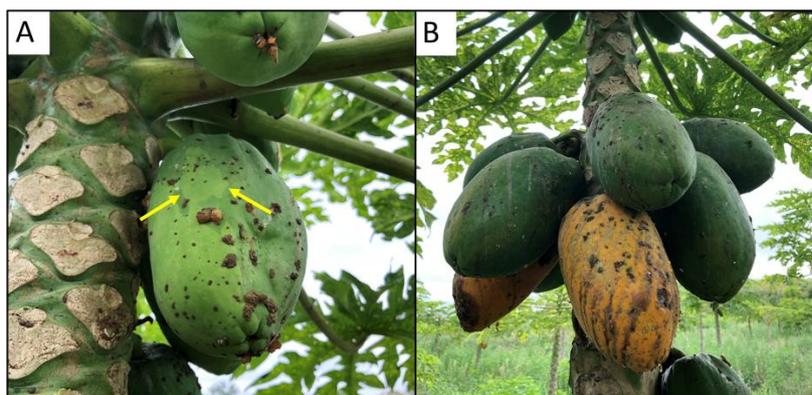


Ilustración 3: Síntomas en *C. papaya* por infección con PpVQ y PSFaV. Exudación espontánea de látex en frutos y necrosis en ápice de hojas inmaduras y ápice foliar en *C. papaya* [Por: (Reyes-Proañó et al., 2022)].

A partir de lo descrito por (Reyes-Proañó et al., 2022), PSFaV posee un genoma monopartito de ARN bicatenario con dos ORF que codifican para la cápside proteica y la ARN polimerasa. También se presume de una señal hipotética de cambio de marco ribosómico -1 para la traducción potencial de una proteína CP-Pol fusionada como se expone en la Ilustración 4.

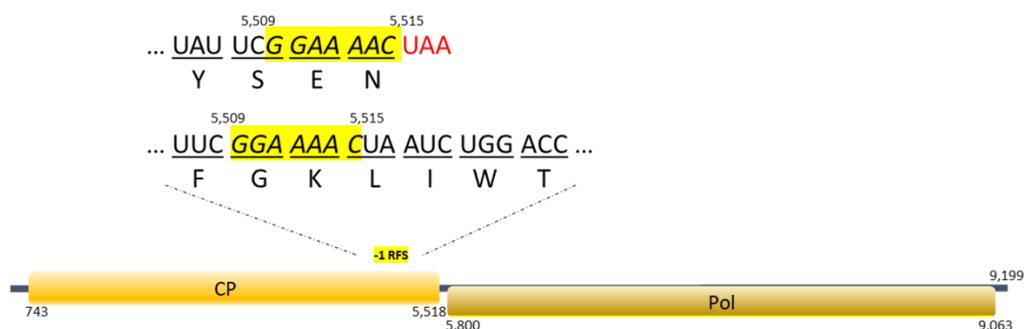


Ilustración 4: Organización genómica de PSFaV [Por: (Reyes-Proañó et al., 2022)].

La detección de PSFaV mediante RT-PCR convencional emplea cebadores que amplifican regiones comprendidas entre la cápside proteica y la polimerasa.

Papaya Virus Q (PpVQ)

El virus Q de la papaya es un Umbra-like virus relacionado con el género *Umbravirus*, familia *Tombusviridae* del orden *Tolivirales*. Fue descrito por primera vez en 2015 por (Quito-Avila et al., 2015) como un virus de genoma monopartito de ARN monocatenario de sentido positivo cuya distribución dentro del territorio

ecuatoriano ha sido reportada en las provincias de Guayas, Los Ríos, Santo Domingo y Santa Elena infectando cultivares de Papaya como Passion Red y Sunrise. Estudios posteriores realizados por (Cornejo-Franco et al., 2018) no atribuyen alguna sintomatología en infecciones simples, además, mencionan que PpVQ es encontrado frecuentemente en coinfección con PRSV.

PpVQ es un virus que está relacionado molecularmente con PMeV2, un *Umbravirus* reportado por investigadores brasileños dos años más tarde (Sá Antunes et al., 2016). En dicho artículo, se plantea la relación entre la infección simultánea por PMeV y PMeV2 con la exudación de látex en frutos y necrosis apical en las hojas inmaduras. Descritos como signos de PSD (Papaya Sticky Disease) o enfermedad pegajosa de la papaya. En la Ilustración 5 se describen las similitudes entre el genoma de PpVQ con sus homólogos PMeV2 y una variante reportada en México (PMeV-Mx). Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, de sus siglas en inglés) los *Umbravirus* requieren de otro virus que codifique una cápside proteica, ya que estos carecen de un ORF que traduzca uno propio (ICTV, 2021).

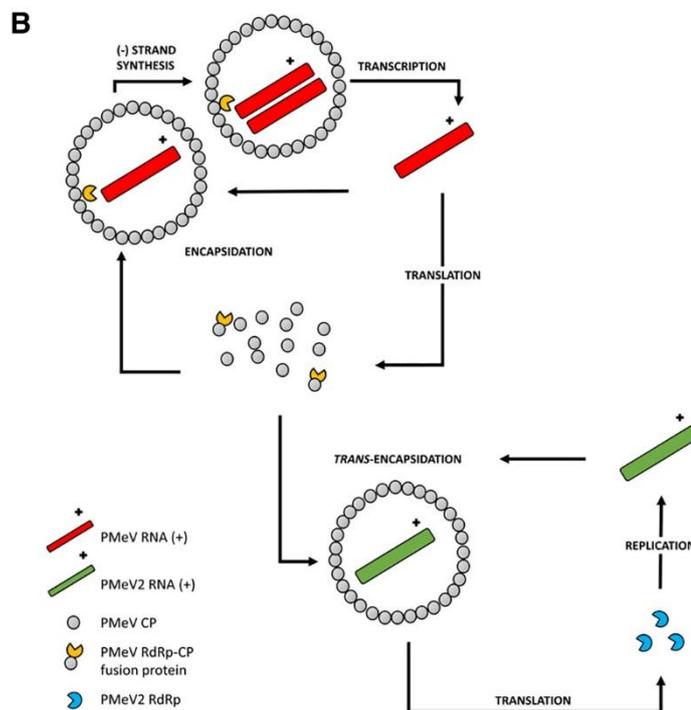
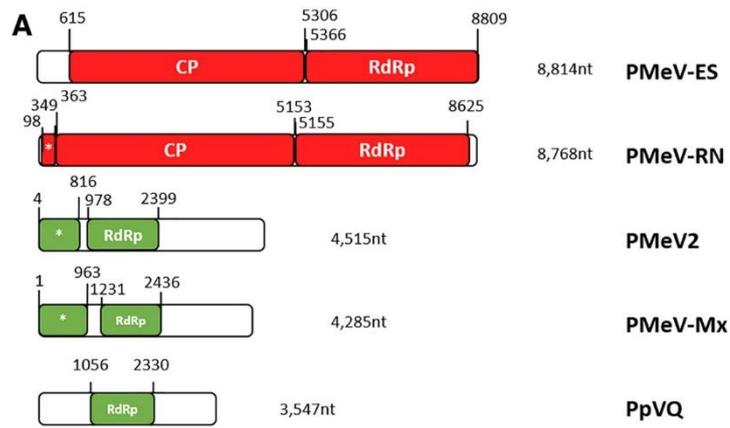


Ilustración 5: Dinámica entre Umbravirus y Tombusviridae en plantas con síntomas de PSD [Por: Sa Antunes et al., 2020].

Papaya Virus E

El virus E de la papaya pertenece al género *Cytorhabdovirus*, familia *Rhabdoviridae* y orden *Mononegavirales*. Su primer registro data del 2016 cuando fue identificado en una planta de *C. papaya* cv. Sunrise utilizado anteriormente como parte del estudio epidemiológico de PpVQ y su relación con PRSV (Medina-Salguero et al., 2019). Su distribución dentro del Ecuador abarca las provincias de

Guayas, Los Ríos y Manabí. Por el momento, no se ha descrito sintomatología exclusiva a la infección de este virus en los hospederos.

De acuerdo con la Ilustración 6, “PpVE es un virus de ARN monocatenario de sentido negativo que contiene 6 ORFs en el orden canónico clásico de los *rhabdovirus* vegetales monopartitos (ORF1=N, ORF2=P, ORF3=P3, ORF6=M, ORF7=G, ORF8=L) y dos ORF accesorios cortos (ORF4=P4 y ORF5=P5) entre P3 y M” (Medina-Salguero et al., 2019).

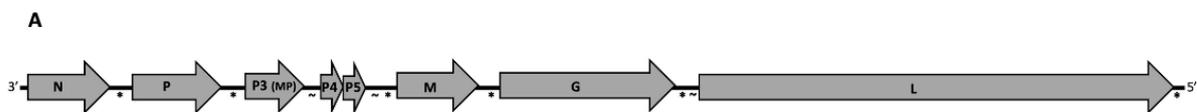


Ilustración 6: Organización genómica de PpVE [Por: (Medina-Salguero et al., 2019)]

La detección de este virus a través de RT-PCR se efectúa con cebadores que amplifican un fragmento conservado del gen de la fosfoproteína.

1.4.3. Métodos de detección de virus en plantas

Los virus en plantas carecen de métodos de remediación, solo de mitigación, por lo que su detección oportuna debe ser rápida, efectiva y de alta resolución. En un inicio, la identificación de los virus en plantas se realizaba mediante precipitación antígeno-anticuerpo (González-Garza, 2017). Sin embargo, esta técnica puede presentar reacciones cruzadas incluso entre especies de virus similares, motivo por el cual se lo ha empleado como método de clasificación para nuevos virus en plantas a nivel de subgrupos (Gallo-García et al., 2018).

De acuerdo con lo descrito por Abreu et al. (2012) las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) figura como la metodología más precisa para detectar y cuantificar la cantidad de material genético viral en la muestra. Sin embargo, al implementar una metodología de detección múltiple, la cantidad de objetivos se ve limitada por el número de sondas que pueden ser detectadas en una sola reacción (Thermofisher, 2022)(Henegariu et al., 1997). Por otro lado, la detección mediante RT-PCR punto final, nos permite determinar de

forma cualitativa la presencia de material genético viral en una muestra; además de que no existe una limitante en el número de objetivos a amplificar (Xu et al., 2012).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de amplificación exponencial de un fragmento específico de interés a partir de una secuencia de ADN (Bhatia & Dahiya, 2015)(Wages, 2004). Este proceso se logra a través de la repetición de ciclos térmicos siguiendo tres pasos esenciales:

Desnaturalización del ADN en dos cadenas sencillas a (90 - 95 °C), hibridación de cebadores de oligonucleótidos con las secuencias objetivo de las hebras de ADN separadas (55 - 58°C), y síntesis del ADN a partir del extremo 3-OH de cada cebador por la ADN polimerasa a (68 - 72°C) (Bhatia & Dahiya, 2015).

Sin embargo, para la detección de algunos virus con material genómico de ARN es necesario un paso previo a la PCR. “La PCR se puede utilizar para detectar y cuantificar el ARN si este se transcribe primero de forma inversa a ADN complementario (ADNc)” (Wages, 2004). En primer lugar, el ARN extraído se convierte en una molécula de ADN complementario (ADNc) por la acción de la ADN polimerasa dependiente de ARN, también conocida como transcriptasa inversa, durante el proceso de transcripción inversa (RT). A continuación, el ADNc se puede utilizar como para la amplificación por PCR de una secuencia objetivo (Nikiforova & Nikiforov, 2019).

Como lo menciona Mandel et al. (1995)., los genes constitutivos son aquellos que se expresan por igual en todas las células de un organismo y en la mayoría de las condiciones ambientales. Por ende, el uso de un gen constitutivo, en este caso *ndhB* de *C. papaya*, en el multiplex sirve como un control de calidad para el proceso de extracción de ARN y de los procesos moleculares siguientes (RT y PCR). De forma que al observar los resultados del multiplex la presencia del gen *ndhB* nos permite inferir que los procesos de detección, desde la extracción de ARN, se han realizado de manera adecuada.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1. Análisis de secuencias

2.1.1. Alineamiento múltiple

Con el fin de conseguir una amplia base de datos para trabajar el diseño de cebadores de cada virus, se escogieron 70, 2, 2, 1 secuencias genómicas para PRSV, PSFaV, PpVQ y PSFaV respectivamente de la plataforma NCBI (Apéndice A).

En cada set de secuencias se realizó un alineamiento múltiple en el programa Geneious (Kearse et al., 2012) para determinar las regiones más conservadas de cada virus. Estas regiones fueron contrastadas en NCBI para la evaluación de la especificidad de los cebadores.

2.1.2. Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se emplearon oligonucleótidos de entre 20 y 25 pb de las regiones más conservadas en cada virus (PRSV, PpVE, PpVQ y PSFaV) (Ilustración 7, Ilustración 8, Ilustración 9). Para el gen constitutivo de la planta, se emplearán los siguientes cebadores diseñados por Tzanetakis et al. (2007). Cebador iniciador: 5'GGACTCCTGACGTATACGAAGGATC3' mientras que el Cebador reverso: 5'AGTAGATGCTATCACACATACAAT3' que amplifican el ARNm de la NADH deshidrogenasa ND2 subunidad B (ndhB). Las secuencias finales e información pertinente sobre cada cebador se encuentran detalladas en la Tabla 1.

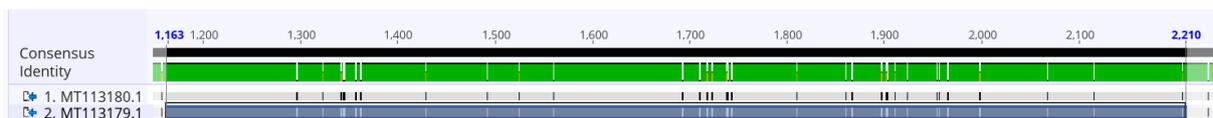


Ilustración 7: Región conservada de PpVQ (Gen polimerasa)

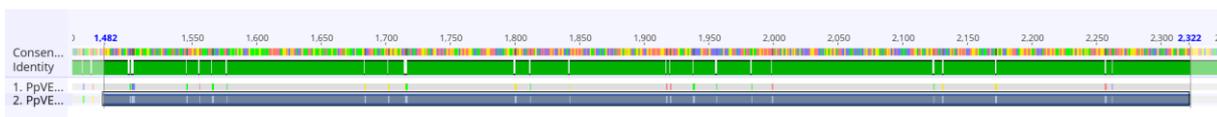


Ilustración 8: Región conservada de PpVE (Gen fosfoproteína)



Ilustración 9: Región conservada de PRSV (Gen cápside proteica)

Tabla 1: Cebadores diseñados para detección de virus en *C. papaya*

Objetivo	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)	Región amplificada
PRSV	F: TTTGGTCGTGGTGGTGGTTT TTTGACTGACATTAGCCTCGCT	402	Gen cápside proteica
	R: TTTGGTCGTGGTGGTGGTTT CTGTATGGAGACTCAGAGAACTCG		
PpVE	F: GAGGATCTACAAGCCTTGACC	862	Gen fosfoproteína
	R: GAAGATCTCGACTATCCCCTCT		
PpVQ	F: CGTGGVTTYTGTAAGGGT	1100	Gen polimerasa
	R: ATCGGAACKCCATCACACAA		
PSFaV	F: GGACAAGGCAGACATTGTCTC	288	Gen cápside proteica y gen polimerasa
	R: CGGTAACGTTCTACCATTATCC		
ndhB	F: AGTAGATGCTATCACACATACAAT	721	Gen ndhB
	R: GGACTCCTGACGTATACGAAGGATC		

2.2. Técnicas moleculares

2.2.1. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ARN total, se realizó una modificación del protocolo empleado por Halgren et al. (2007), que consta de lo siguiente:

1. Homogeneizar 100 mg de tejido foliar sintomático con 1 ml de Buffer de Extracción ajustado al 1% de B-mercaptoetanol.
2. Centrifugar a 5000 rpm x 3 minutos. Tomar el sobrenadante y homogeneizarlo en Acetato de potasio 6M en relación 1:1.
3. Centrifugar a máxima velocidad (13 000 rpm) por 10 minutos. Homogeneizar el sobrenadante en Isopropanol 100% en relación 1:1.
4. Centrifugar a máxima velocidad por 30 minutos y lavar dos veces el pellet con Buffer de lavado y sílica sin recambio de la última.
5. Secar la sílica y resuspender en 100 μ l de agua ultrapura estéril a 65°C. Centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos.
6. Recuperar 80 μ l de agua con ARN total y preservar en -20°C.

2.2.2. Generación de ADN complementario

Para la generación de ADNc se emplearon hexámeros aleatorios y se modificó el protocolo del kit de SuperScript III Reverse Transcriptase (ThermoFisher, 2004) según la Tabla 2.

Tabla 2: Cantidades de reactivos por reacción

Reactivo	Volumen (μ l)
Reaction Buffer 5X	3.00
dNTPs 10 μ M	0.50
Random Primers 40 μ M	0.50
SuperScript III RT-Transcriptasa	0.10
DTT	1.50
ARN total	1.00
Agua ultrapura destilada	8.40
Total	15.00

La reacción se dejó incubar la reacción por 45 minutos a 45°C con una posterior desnaturalización a 75°C por 15 minutos para desnaturalizar la enzima.

2.2.3. Amplificación de fragmentos de interés mediante PCR

Para determinar el mejor volumen a emplear de cebadores en cada reacción múltiplex se emplearon tres tratamientos descritos en la Tabla 3.

Tabla 3: Volumen de reactivos

Reactivo	Tratamientos (µl)		
	A	B	C
GoTaq 5X	5.0	7.5	10
PpVE Iniciador	0.4	0.5	0.8
PpVE Reverso	0.4	0.5	0.8
PpVQ Iniciador	0.4	0.5	0.8
PpVQ Reverso	0.4	0.5	0.8
PRSV Iniciador	0.4	0.5	0.8
PRSV Reverso	0.4	0.5	0.8
PMeV Iniciador	0.4	0.5	0.8
PMeV Reverso	0.4	0.5	0.8
ndhB Iniciador	0.4	0.5	0.8
ndhB Reverso	0.4	0.5	0.8
ADNc	1.0	2.0	2.0
Agua	0.0	0.5	0.0
Total	10.0	15.0	20.0

Para los protocolos de termociclado se tomó como base el proporcionado por (Xu et al., 2012) y se encuentra descrito en la Tabla 4.

Tabla 4: Protocolo de termociclado para el sistema de detección múltiple

Ciclos	Reacción	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	10 min
40	Desnaturalización	95°C	40 s
	Hibridación	58°C	50 s
	Extensión	70°C	1 min
1	Extensión Final	70°C	7 min

2.2.4. Electroforesis

El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 2% empleando TAE 1X a un voltaje de 80 voltios por 35 minutos. Los resultados fueron visualizados empleando el sistema de documentación de gel FastGene Fas-DIGI Compact - NIPPON Genetics EUROPE.

2.3. Diseño de sistema múltiplex

2.3.1. Determinación de combinaciones para sistema de detección múltiplex

Para determinar las posibles combinaciones del sistema de detección se empleó un diseño factorial con la finalidad de obtener las posibles combinaciones de detección, las cuales se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5: Posibles combinaciones de cebadores para implementación de PCR tríplex.

	PpVE	PpVQ	PSFaV	PRSV	
PpVE		PpVE PpVQ ndhB	PpVE PSFaV ndhB	PpVE PRSV ndhB	ndhB
PpVQ	PpVQ PpVE ndhB		PpVQ PSFaV ndhB	PpVQ PRSV ndhB	
PSFaV	PSFaV PpVE ndhB	PSFaV PpVQ ndhB		PSFaV PRSV ndhB	
PRSV	PRSV PpVE ndhB	PRSV PpVQ ndhB	PRSV PSFaV ndhB		

2.4. Validación

La validación de los cebadores diseñados constó de dos etapas. En cada una se demostró la coincidencia entre la detección individual de cada virus y la detección múltiplex. Cada set de cebadores fue sometido a prueba de sensibilidad, mismo que consistió en diluciones seriadas 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 (D1, D2, D3, D4), a partir de una muestra de ADNc generado a partir de 1 µl de ARN total a

una concentración de 1769.15 ng/ μ l proveniente de plantas de *C. papaya* sintomáticas.

2.4.1. Validación Individual de cebadores

En esta etapa de validación, se empleó muestras de *C. papaya* con infecciones múltiples con la finalidad de comprobar la especificidad de los cebadores empleados. Para ello se hicieron diagnósticos individuales de 10 μ l, descritos en la Tabla 6.

Tabla 6: Concentraciones de reacción de PCR individual.

Reactivo	Volumen (μ l)
GoTaq 5X	5.00
Cebador iniciador	0.50
Cebador reverso	0.50
ADNc	1.00
Total	10.00

El protocolo de termociclado para la detección individual para PSFaV, PRSV, PpVE Y PpVQ se encuentra descrito en la Tabla 7 y la temperatura de hibridación se determinó mediante el uso de la herramienta Geneious (Geneious, 2017).

Tabla 7: Protocolo de termociclado individual.

Ciclos	Reacción	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	4 min
40	Desnaturalización	95°C	40 seg
	Hibridación	55°C	40 seg
	Extensión	72°C	1 min
1	Extensión Final	72°C	7 min

2.4.2. Validación Múltiplex

Para la validación del sistema múltiplex, se emplearon muestras de infecciones simples y complejas. Las infecciones simples permitieron determinar la especificidad

y reactividad de los cebadores mientras que las muestras de ARN de infecciones complejas validaron la sinergia de los cebadores.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Sistema de detección múltiple

3.1.1. Validación individual de cebadores

Una vez sintetizados los cebadores, estos fueron validados individualmente con la finalidad de determinar las temperaturas óptimas de hibridación, así como su nivel de especificidad. En la Ilustración 10, se puede observar las validaciones a diferentes temperaturas de hibridación.

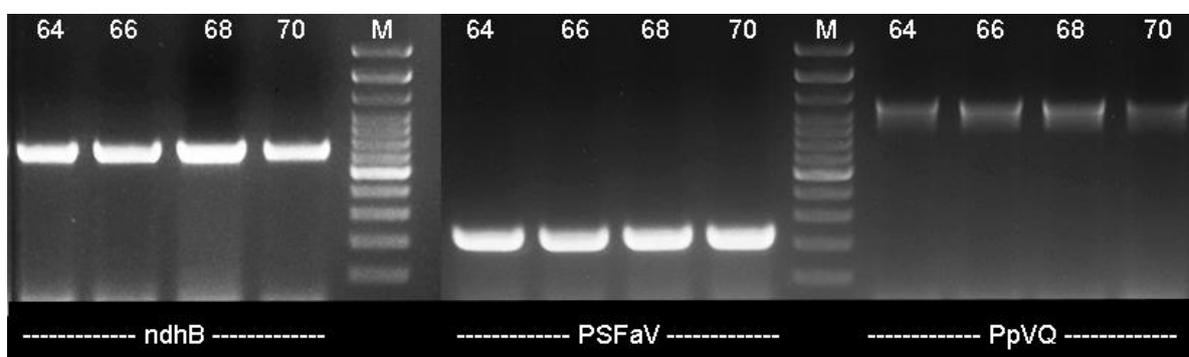


Ilustración 10: Validación individual de los cebadores sintetizados a diferentes temperaturas (ndhB, PSFaV, PpVQ).

De acuerdo con la Ilustración 10, los cebadores diseñados muestran un alto nivel de especificidad al igual que un buen rendimiento a temperaturas de hibridación comprendidas entre 64 a 70 °C. Por otro lado, en la Ilustración 11 podemos observar la validación de los cebadores PRSV y PpVE. En dicho rango de temperaturas de hibridación ambos demuestran una alta especificidad y rendimiento.

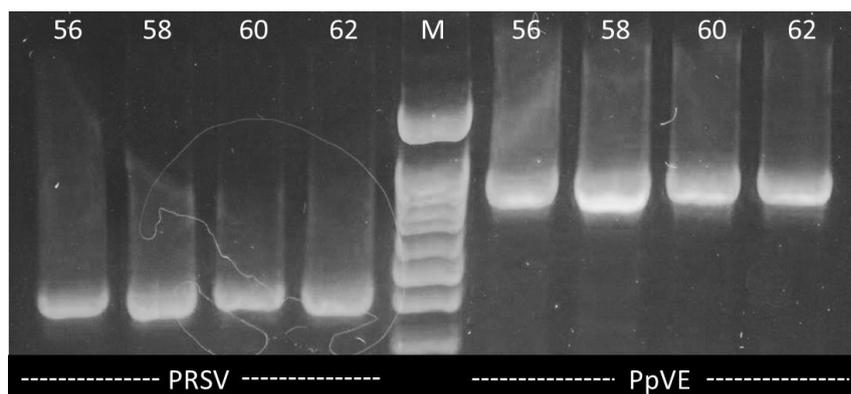


Ilustración 11: Validación individual de los cebadores sintetizados a diferentes temperaturas (PRSV, PpVE) [M: marcador molecular].

3.1.2. Sistemas de detección compatibles

Para determinar la compatibilidad de los sistemas de detección tríplex a diferentes temperaturas, se realizaron ensayos a diferentes temperaturas de hibridación 55, 58 y 60 grados Celsius. El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa siguiendo las especificaciones anteriormente descritas.

3.1.2.1. *PpVE + PpVQ + ndhB*

Como se puede observar en la Ilustración 12, existe compatibilidad entre *ndhB* y *PpVQ*, no así con *PpVE*. Se observa alta especificidad por parte de los cebadores *PpvQ* y *ndhB* y no se visualizan cambios significativos a temperaturas de hibridación entre 55 y 60 grados Celsius.

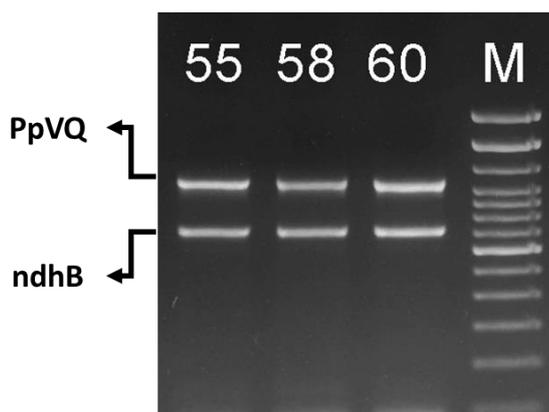


Ilustración 12: Resultados del sistema *PpVE*, *PpVQ*, *ndhB*. [M: marcador molecular]

3.1.2.2. *PpVE + PSFaV + ndhB*

De acuerdo con la Ilustración 13, este sistema demuestra compatibilidad a una temperatura de hibridación comprendida entre 55 y 58 grados Celsius. A 58°C las concentraciones de los amplicones para *PpVE* y *ndhB*, poseen una intensidad similar.

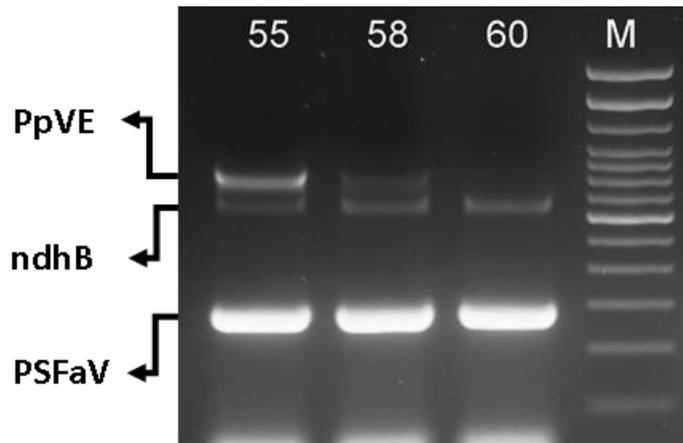


Ilustración 13: Resultados del sistema PpVE, PSFaV, ndhB. [M: marcador molecular]

3.1.2.3. *PpVE + PRSV + ndhB*

Según lo observado en la Ilustración 14, se observa compatibilidad en el sistema. La nitidez y especificidad aumenta conforme aumenta la temperatura de hibridación. Los resultados óptimos se observan a 58°C. No se observa diferencias en la intensidad entre los amplicones.

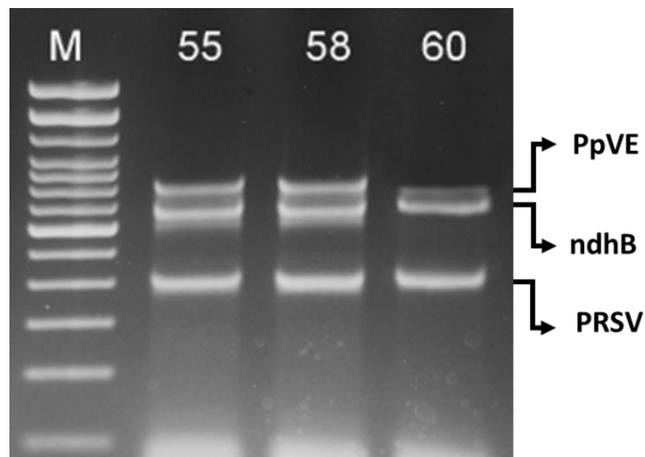


Ilustración 14: Resultados del sistema PpVE, PRSV, ndhB. [M: marcador molecular]

3.1.2.4. *PpVQ + PSFaV + ndhB*

De acuerdo con lo observado en la Ilustración 15, se observa compatibilidad en el sistema cuando la temperatura de hibridación se comprendió entre 60 a 62 grados Celsius. A diferencia de los otros ensayos, este comprendió un rango de 58 a 62°C debido a la composición de los cebadores.

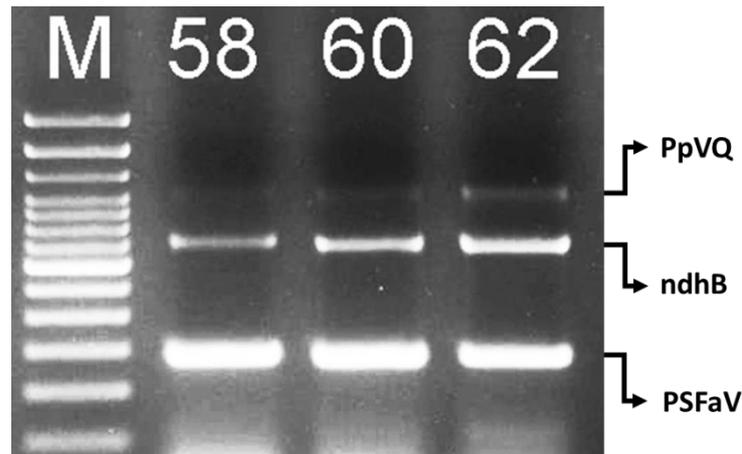


Ilustración 15: Resultados del sistema PpVQ, PSFaV, ndhB. [M: marcador molecular]

3.1.2.5. *PpVQ + PRSV + ndhB*

Existe incompatibilidad entre los cebadores PRSV-PpVQ, por lo que no se observan sus amplicones correspondientes en la Ilustración 16.

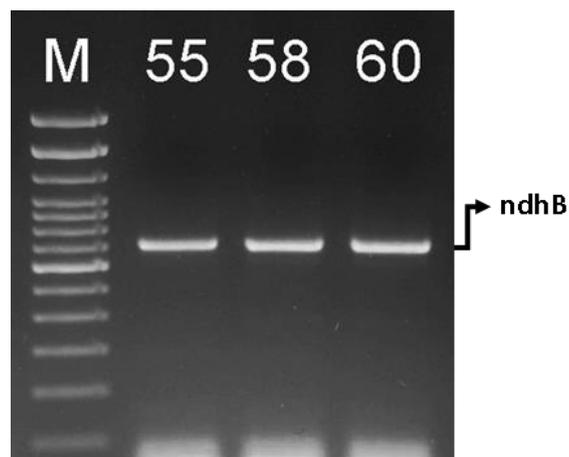


Ilustración 16: Resultados del sistema PpVQ, PRSV, ndhB. [M: marcador molecular]

3.1.2.6. *PSFaV + PRSV + ndhB*

En esta reacción no se observó amplicón de 721 pb correspondiente al gen constitutivo de la planta, ndhB, por lo cual se desestima la compatibilidad del sistema tríplex Ilustración 17. No se observa inhibición o inespecificidades entre los cebadores de PRSV-PSFaV.

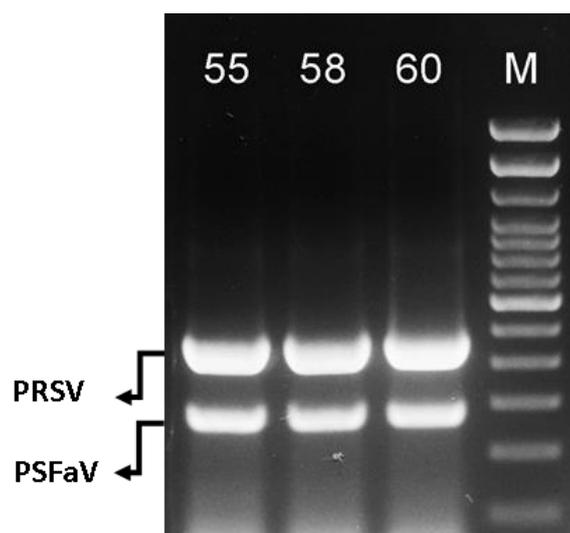


Ilustración 17: Resultados del sistema PSFaV, PRSV, ndhB. [M: marcador molecular]

3.1.3. Concentraciones óptimas

En base a lo observado en el apartado anterior, se procedió a registrar las concentraciones óptimas de cada set de cebadores para la detección de los objetivos, junto con el protocolo PCR final de cada sistema como se puede observar en la Tabla 8 y Tabla 9.

Tabla 8: Concentraciones de reacción PCR del sistema PRSV, PpVE, ndhB

Reactivo	Volumen (µl)
GoTaq 5X	5.0
PpVE Iniciador [40 µM]	1.0
PpVE Reverso [40 µM]	1.0
PRSV Iniciador [40 µM]	0.5
PRSV Reverso [40 µM]	0.5
ndhB Iniciador [40 µM]	0.5
ndhB Reverso [40 µM]	0.5
ADNc	2.0
Agua	4.0
Total	15.0

Tabla 9: Concentraciones de reacción PCR del sistema PSFaV, PpVQ, ndhB

Reactivo	Volumen (μl)
GoTaq 5X	5.0
PpVQ Iniciador [40 μM]	1.0
PpVQ Reverso [40 μM]	1.0
PSFaV Iniciador [4 μM]	1.0
PSFaV Reverso [4 μM]	1.0
ndhB Iniciador [40 μM]	1.0
ndhB Reverso [40 μM]	1.0
ADNc	2.0
Agua	2.0
Total	15.0

3.1.4. Protocolos de termociclado óptimos

El protocolo óptimo de termociclado para la detección simultánea de PpVQ, PSFaV y ndhB se encuentra descrito en la Tabla 10.

Tabla 10: Condiciones de termociclado para la detección simultánea de PpVQ, PSFaV y ndhB,

Ciclos	Reacción	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	10 min
40	Desnaturalización	95°C	40 seg
	Hibridación	62°C	40 seg
	Extensión	72°C	1 min
1	Extensión Final	72°C	10 min

Mientras que para la detección óptima de PRSV, PpVE y ndhB, se detalla a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11: Condiciones de termociclado para la detección simultánea de PRSV, PpVE y ndhB,

Ciclos	Reacción	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	10 min
40	Desnaturalización	95°C	40 seg
	Hibridación	58°C	40 seg
	Extensión	72°C	1 min
1	Extensión Final	72°C	10 min

3.2. Análisis de sensibilidad

A partir de las diluciones seriadas, en donde 10^0 corresponde a la muestra sin diluir, se obtuvieron los siguientes resultados de sensibilidad reflejados en la Ilustración 18 e Ilustración 19. Para el tríplex de PpVQ, PSFaV y ndhB se puede observar una detección hasta 10^{-2} (1/100) de los cebadores PpVQ y ndhB, mientras que PSFaV pierde eficacia en 10^{-1} en adelante. No obstante, el tríplex de PpVE, PRSV y ndhB consigue una detección estable de todos los cebadores hasta la dilución 10^{-1} (1/10). Por consiguiente, el poder de detección de los cebadores en ambos tríplex logrará alcanzar una resolución eficaz hasta 1/10 o 10^{-1} .

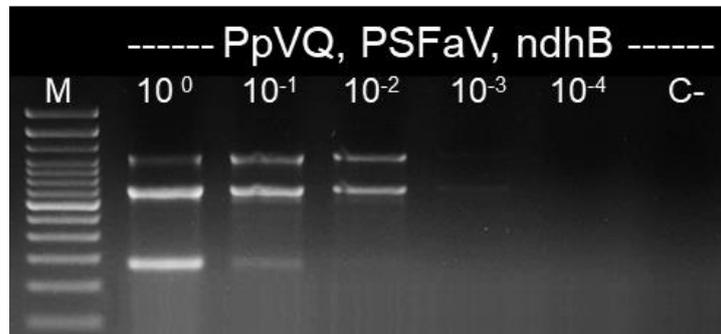


Ilustración 18: Ensayo de sensibilidad del tríplex PpVQ, PSFaV, ndhB. [M: marcador molecular]

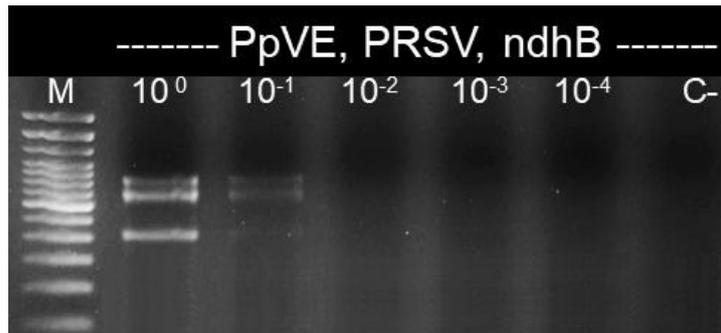


Ilustración 19: Ensayo de sensibilidad del tríplex PpVE, PRSV, ndhB. [M: marcador molecular]

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

En base al análisis bioinformático basado en las secuencias genómicas de los virus PRSV, PpVQ, PSFaV y PpVE, se determinó secuencias conservadas para cada virus, de forma que se diseñaron cebadores (iniciador y terminador) con un alto nivel de especificidad.

La validación de las reacciones tríplex a diferentes temperaturas de hibridación, permitió optimizar el protocolo de termociclado mientras se validó la compatibilidad de los cebadores empleados. De esta forma, se obtuvo exitosamente tres reacciones tríplex: PpVE + PRSV + ndhB, PSFaV + PpVQ + ndhB y PpVE, PSFaV y ndhB. De los cuales, se optimizó PpVE + PRSV + ndhB y PpVQ, PSFaV y ndhB ya que con ambas reacciones se logran detectar todos los virus comprendidos en este estudio. La concentración de los cebadores empleados para la detección de PSFaV fueron ajustados con la finalidad de evitar la predominancia de un amplicón en el producto de PCR.

El diseño de estos sistemas de detección permite reducir a 4 las 15 reacciones requeridas para la detección individual de los virus PRSV, PSFaV, PpVE, PpVQ y el gen constitutivo de la planta, ndhB. De esta forma, se optimiza el uso de reactivos, enzimas y buffers en el diagnóstico de enfermedades virales en *C. papaya*.

Finalmente, el diseño de estos sistemas de detección múltiple es necesario para la reducción de los desechos generados a partir de pruebas de diagnóstico, así como para incrementar la competitividad y productividad en empresas que brinden servicios de diagnóstico agrícola a pequeña y gran escala.

4.2. Recomendaciones

Se recomienda diseñar una reacción quántuplex que permita reducir al mínimo los recursos requeridos para la detección de los virus comprendidos dentro de este estudio.

Finalmente, es recomendable extender estos sistemas de detección múltiplex a otros virus de importancia agrícola, de forma que se reduzca el tiempo requerido para dar un diagnóstico oportuno al agricultor mientras se contribuye a un desarrollo tecnológico con menor generación de residuos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, P. M. v, Antunes, T. F. S., Magaña-Álvarez, A., Pé Rez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Ventura, J. A., Fernandes, A. A. R., & Fernandes, P. M. B. (2015). A Current Overview of the Papaya meleira virus, an Unusual Plant Virus. *Viruses*, 7, 1853–1870. <https://doi.org/10.3390/v7041853>
- Abreu, P. M. v, Piccin, J. G., Rodrigues, S. P., Buss, D. S., Ventura, J. A., & Fernandes, P. M. B. (2012). Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 180(1–2), 11–17. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2011.12.003>
- Antunes Carvalho, F., & Renner, S. S. (2012). A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2012.05.019>
- Bhatia, S., & Dahiya, R. (2015). Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 121–156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00004-2>
- Cornejo-Franco, J. F., Alvarez-Quinto, R. A., & Quito-Avila, D. F. (2018). Transmission of the umbra-like Papaya virus Q in Ecuador and its association with meleira-related viruses from Brazil. *Crop Protection*, 110(March), 99–102. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.006>
- Desbiez, C., & Lecoq, H. (2021). Papaya Ringspot Virus (Potyviridae). *Encyclopedia of Virology*, 520–527. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21241-7>
- Evans, E. A., Ballen, F. H., & Crane, J. H. (2021). An Overview of US Papaya Production, Trade, and Consumption 1. *IFAS Extension*. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Gallo-García, Y. M., Jaramillo-Mesa, H., Toro-Fernández, L. F., Marín-Montoya, M., & Gutiérrez, P. A. (2018). Characterization of the genome of a novel ilarvirus naturally infecting Cape gooseberry (*Physalis peruviana*). *Archives of Virology*, 163(6), 1713–1716. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3796-8>
- Geneious. (2017). *Geneious R11* (No. R11). <https://www.geneious.com>

- Gonsalves, D., Triparthi, J., Carr, B., & Suzuki, J. Y. (2010). Papaya Ringspot Virus. *Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2010-1004-01>
- González-Garza, R. (2017). Evolution of diagnostic technics for plant viruses. Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 591–610. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-1>
- Granda-Villagómez, M. J. (2021). *Estudio de pre-factibilidad para la exportación de papaya al mercado canadiense en el período 2020-2025*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Halgren, A., Tzanetakis, I. E., & Martin, R. R. (2007). Identification, characterization, and detection of black raspberry necrosis virus. *Phytopathology*, 97(1), 44–50. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0044>
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23(3), 504–511. <https://doi.org/10.2144/97233RR01>
- ICTV. (2021). *Umbravirus*. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/293/umbravirus
- Jiménez Díaz, J. A. (2002). *Manual práctico para el cultivo de la papaya hawaiana* (Primera). EARTH.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., & Valencia, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Mandel, T., Fleming, A. J., Krähenbühl, R., & Kuhlemeier, C. (1995). Definition of constitutive gene expression in plants: the translation initiation factor 4A gene as a model. *Plant Molecular Biology* 1995 29:5, 29(5), 995–1004. <https://doi.org/10.1007/BF00014972>
- Medina-Salguero, A. X., Cornejo-Franco, J. F., Grinstead, S., Mollov, D., Mowery, J. D., Flores, F., & Quito-Avila, D. F. (2019). Sequencing, genome analysis and

- prevalence of a cytorhabdovirus discovered in *Carica papaya*. *PLoS ONE*, 14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215798>
- Mishra, R., & Patil, B. (2018). *First Complete Genome Sequence of a Distinct Papaya Ringspot Virus Isolate from the Northeastern Region of India* (pp. 1–2). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00437-18>
- Nikiforova, M., & Nikiforov, Y. (2019). Molecular Anatomic Pathology : Principles, Techniques, and Application to Immunohistologic Diagnosis. In *Diagnostic Immunohistochemistry Theranostic and Genomic Applications* (Fifht). Elsevier.
- PRO ECUADOR. (2015). *Estudio introductorio de papaya al mercado de EE.UU.*
- Quito-Avila, D. F., Alvarez, R. A., Ibarra, M. A., & Martin, R. R. (2015). Detection and partial genome sequence of a new umbra-like virus of papaya discovered in Ecuador. *European Journal of Plant Pathology*, 143(1), 199–204. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0675-y>
- Reyes-Proaño, E., Cornejo-Franco, J. F., Alvarez-Quinto, R., Mollov, D., Karasev, A. v, & Quito-Avila, D. F. (2022, August 6). ‘Sticky’ disease of papaya in Ecuador: same disease as in Brazil but caused by two different viruses? *Plant Health Annual Meeting* .
- Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., & Rivas-Valencia, P. (2011). Presencia de fitoplasmas en papayo (*Carica papaya*) en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17(1), 47–50.
- Sá Antunes, T. F., Amaral, R. J. V.-, Ventura, J. A., Godinho, M. T., Amaral, J. G., Souza, F. O., Zerbini, A., Zerbini, F. M., & Bueno-Fernandes, M. P. (2016). The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155240>
- Sa Antunes, T. F., Maurastoni, M., Madroño, L. J., Fuentes, G., Santamaria, J. M., Ventura, J. A., Abreu, E. F., Fernandes, A. A. R., & Fernandes, P. M. B. (2020). Battle of three: The curious case of papaya sticky disease. *Plant Disease*, 104(11), 2754–2763. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2622-FE>
- Siar, S. v., Beligan, G. A., Sajise, A. J. C., Villegas, V. N., & Drew, R. A. (2011). Papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya* via introgression from

- Vasconcellea quercifolia. *Euphytica*, 181(2), 159–168.
<https://doi.org/10.1007/s10681-011-0388-z>
- Subgerencia de Análisis de Productos y Servicios. (2020). *Ficha sectorial: Otros cultivos de frutas tropicales y subtropicales*. <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2020/ficha-sectorial-4-trimestre-2020/FS-Otros-Cultivos-de-Frutas-Tropicales-y-Subtropicales-4T2020.pdf>
- ThermoFisher. (2004). SuperScript III Reverse Transcriptase (200U/μL) #18080-085. *Manual*, 18080, 1–4. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2FsuperscriptIII_man.pdf
- ThermoFisher. (2022). *What is multiplex qPCR?* Online. <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/what-is-multiplex-qpcr.html#three>
- Tzanetakis, I. E., Postman, J. D., & Martin, R. R. (2007). Identification, detection and transmission of a new vitivirus from *Mentha*. *Arch Viro*, 152, 2027–2033. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1030-1>
- Viralzone. (2022). *Potyvirus*. Online. <https://viralzone.expasy.org/50>
- Wages, J. M. (2004). Polymerase Chain Reaction. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*, 243–250. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00475-1>
- Xu, W., Zhai, Z., Huang, K., Zhang, N., Yuan, Y., Shang, Y., & Luo, Y. (2012). A novel universal primer-multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis analysis. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022900>

APÉNDICE

Apéndice A: Números de accesoión de los genomas empleados en este estudio

Número de accesoión	Virus
AB369277	PRSV
AY010722	PRSV
AY027810	PRSV
AY162218	PRSV
AY231130	PRSV
DQ340769	PRSV
DQ340770	PRSV
DQ340771	PRSV
DQ374152	PRSV
DQ374153	PRSV
EF017707	PRSV
EF183499	PRSV
EU126128	PRSV
EU475877	PRSV
EU882728	PRSV
HQ424465	PRSV
JX448369	PRSV
JX448370	PRSV
JX448371	PRSV
JX448372	PRSV
JX448373	PRSV

KC345609	PRSV
KF734962	PRSV
KF791028	PRSV
KT275937	PRSV
KT275938	PRSV
KT633943	PRSV
KT895257	PRSV
KX235326	PRSV
KX655860	PRSV
KX655861	PRSV
KX655862	PRSV
KX655863	PRSV
KX655864	PRSV
KX655865	PRSV
KX655866	PRSV
KX655867	PRSV
KX655868	PRSV
KX655869	PRSV
KX655870	PRSV
KX655871	PRSV
KX655872	PRSV
KX655873	PRSV
KX655874	PRSV

KX998707	PRSV
KX998708	PRSV
KY039583	PRSV
KY271954	PRSV
KY933061	PRSV
KY996464	PRSV
MF074214	PRSV
MF085000	PRSV
MF356497	PRSV
MF405295	PRSV
MF405296	PRSV
MF405297	PRSV
MF405298	PRSV
MF405299	PRSV
MG030689	PRSV
MH404259	PRSV

MH404260	PRSV
MH404261	PRSV
MH404262	PRSV
MH404263	PRSV
MH404264	PRSV
MT747167	PRSV
MH974109	PRSV
MH974110	PRSV
X67673	PRSV
X97251	PRSV
MW239071	PpVE
MH282832	PpVE
MT113180	PpVQ
MT113179	PpVQ
NC_028378	PMeV